

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-213886
(43)Date of publication of application : 05.08.1994

(51)Int.CI. G01N 33/52
G01N 31/22

(21)Application number : 05-004153 (71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD
(22)Date of filing : 13.01.1993 (72)Inventor : KITAJIMA MASAO
TEZUKA SHIGERU
ARAI FUMITADA
OGAWA MASASHI

(54) MULTIPLE-ITEM ANALYSIS METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To analyze multiple items with a sufficient accuracy simply by supplying a small amount of liquid sample, especially a humor sample, to an analysis element once, and further surely store and transfer analysis elements after supplying the sample.

CONSTITUTION: At least hydrophilic polymer layer and porous development layer are laminated in this order on a water-unpermeable support. A specimen is spotted at a multilayer analysis element which does not contain a measurement reagent, the porous development layer is fractionated after drying, and then a measurement reagent causing each different detection reaction to occur is spotted to each fractionated part, and then measurement is made.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.06.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3147560

[Date of registration] 12.01.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-213886

(43)公開日 平成6年(1994)8月5日

(51)Int.Cl.
G 0 1 N 33/52
31/22

識別記号 庁内整理番号
B 7055-2 J
1 2 1 G 7132-2 J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 16 頁)

(21)出願番号 特願平5-4153

(22)出願日 平成5年(1993)1月13日

(71)出願人 000005201

富士写真フィルム株式会社
神奈川県南足柄市中沼210番地

(72)発明者 北島 昌夫

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内

(72)発明者 手塚 滋

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内

(72)発明者 新井 文規

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内

(74)代理人 弁理士 田中 政浩 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多項目分析方法

(57)【要約】

【目的】 微量の液体試料、特に体液試料を分析要素に
一回供給するだけで十分な精度で多項目の分析ができ、
更に、試料供給後の分析要素を確実に保存・移送できる
多項目分析方法を提供する。

【構成】 水不浸透性支持体の上に、少なくとも親水性
ポリマー層、多孔性展開層がこの順に積層されている、
測定試薬を含まない多層分析要素に検体を点着し、乾燥
後、少なくとも該多孔性展開層を分画し、その後分画さ
れた各部分にそれぞれ異なった検出反応を起こす測定試
薬を点着し、測定を行うことを特徴とする多項目分析方
法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 水不浸透性支持体の上に、少なくとも親水性ポリマー層、多孔性展開層がこの順に積層されている、測定試薬を含まない多層分析要素に検体を点着し、乾燥後、少なくとも該多孔性展開層を分画し、その後分画された各部分にそれぞれ異なった検出反応を起こす測定試薬を点着し、測定を行うことを特徴とする多項目分析方法。

【請求項2】 請求項1において、該多孔性展開層が熱可塑性樹脂からなり、前記分画が該熱可塑性樹脂の軟化点以上の温度に加熱して溶断することである多項目分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床分析分野等において少量の試料で多項目を測定でき、また、液体試料を採取後分析までに時間がかかる場合等に有効な分析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】血液、尿等を検体として人の病気を診断する方法は長く行われている。この方法の一つとして、ウェットケミストリー分析法がある。これは、いわゆる溶液試薬を用いる方法であって歴史も古く、多数の項目について検出試薬も開発されており、測定機も簡易小型機から大型全自動機まで各種ある。ウェットケミストリーに使用される検体は、血漿、血清、尿等であつて、通常全血をそのまま検体として使用することはない。

【0003】ウェットケミストリーでは、保存期間中は試薬の安定性を考慮していくつかの群に分けておき、溶解、調製時に混合することもできるし、試薬添加の手順をいくつかのステップに分けることも可能である。更に、測定検体の数に応じて、適量の試薬を溶解、調製しておくことができるので、1測定当り試薬コストも少なくて済む。多数の溶液の取扱を組み合わせて自動化することは複雑で厄介ではあるが、臨床検査機器の開発は歴史もあり、社会的な要請も高かったので、既に大・中・小いずれの処理能力を必要とする分野についても、効率良い自動機器が開発、実用化されている。

【0004】一方、定性・定量分析に必要な全ての試薬を試薬紙や多層分析フィルムのような分析要素の中に組み込んだ、いわゆるドライケミストリー分析要素が多数開発・商品化され、富士ドライケム（富士写真フィルム（株）製）、エクタケム（米国、イーストマンコダック社製）、ドライラボ（コニカ（株）製）、スポットケム（京都第一化学（株）製）、レフロトロン（独国、ベーリングガーマンハイム社製）、セラライザー（米国、マイルズラボラトリーア社製）等の名称で市販されている。これらドライケミストリー分析要素は、下記のような特徴を有する。

(1) 分析に必要な試薬が全て分析要素の中に組み込まれ

ている。

(2) 検体（通常は血清、血漿、尿、1部項目については全血）を点着するだけで分析に必要な反応を起こす。

【0005】ドライケミストリー分析要素は、その利用分野によって3種に大別される。

分類1：開業医、家庭等でのスクリーニングを目的としており、目視検査により定性（+/-）か半定量（5段階程度）の結果が判別できるもの。

分類2：小型簡易操作を特徴とした測定機との組合せにより、測定場所を比較的自由に選べるもの。緊急検査室、小児病棟、開業医、小規模病院等で使用される。

分類3：全自動機を使用し、病院や検査センターのルーチン測定に使用されるもの。

分析要素の構成や内容も上記分類に応じて異なる。

【0006】分類1に供される分析要素は、尿検査や血糖試験紙に代表されるものであって、分析操作は簡便でかつ機器も不要であるが、大雑把な判定（正常か異常か等）が得られるのみであり、必要な場合には定量的な結果が得られる他の分析手段により再測定されることを前提としている。この方法による分析要素は、臨床検査技師や医師、看護婦等の専門家による操作を前提としてはおらず、検体処理もしなくて良いように、尿や全血を直接検体とすることができるのが普通である。

【0007】分類2に属するものは、定量分析を目的としており、機器による定量的な測定を前提としている。操作そのものは、分類1程ではないが比較的簡単であつて、臨床検査技師等の専門家を前提とはしていない。検体については、全血、血漿、血清、尿のいずれも使用できる分析要素が開発されつつあるが、全血で測定可能な項目数はなお10数項目であつて、比較的制限されている。

【0008】分類3の全自動機に使用される検体は通常血漿、血清、尿に限られており、全血を検体とすることはできない。但し、測定可能な項目は順次増加してきており、少なくとも40項目以上について分析要素が開発されている。

【0009】また、本発明者はドライケミストリー分析要素の保存方法として、液体試料の点着がされた分析要素を、点着した液体試料の反応を停止・定着させた後、分析装置にて分析するまでの間、実質的に水分と空気を遮断した状態で保存することを特徴とする分析要素の保存方法を既に開発した（特開平3-289543号公報）。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】上記のウェットケミストリー分析法とドライケミストリー分析要素共通の欠点として検体の調製・供給の問題がある。ウェットケミストリー法では、透明溶液の透過測定を前提としているので、全血検体をそのまま測定試料とすることはできない。即ち、全血検体を採血後、遠心分離した上清の血漿または血清をサンプルカップに移すか、または遠心分離

管そのものをサンプルカップの代わりに測定機にセットする等の方法が取られている。これらの操作を行う煩雑さに加えて、赤血球の混入無しに確実にサンプリングするに十分な血漿または血清の確保という問題がある。

【0011】遠心分離後の血漿 $200\mu l$ を確保するためには、通常 $1.5 \sim 2 ml$ の全血を必要とする。遠心分離やその後の操作を注意深く行ったとしても、最少必要採血量は $500\mu l$ 前後と推定される。一方、分析測定に必要な試料の量は $10\mu l$ ／項目程度であるので、10項目テストしたとしても $100\mu l$ 、20項目テストしたとしても $200\mu l$ に過ぎない。病院等で実際に採血される量は $2 \sim 20 ml$ である。即ち、最終的に必要な血漿量の50～100倍が採血されている。

【0012】注射器を用いて血管に針を刺し、採血されることは健常者であっても精神的、肉体的に苦痛を伴うものであるが、体质的に血管が細く採血が困難な人や病弱な患者については特に、採血に伴う苦痛は想像以上のものであり、更に繰り返し採血される患者にとっては、採血量を最小限に抑えたいという願いは大きい。

【0013】また、病院の採血室あるいは開業医、診療所では、全血を試験管や真空採血管に採取した後、そのままあるいは冷蔵保存した状態で静置により血清を沈降分離させて、中央検査室や検査センターに移送する。あるいは、採取された血液は移送後に初めて遠心分離され、赤血球を始めとする有形成分と、分析試料となる血漿もしくは血清とに分離される。この間、赤血球との共存により分析に影響を与える生化学的反応の進行も考えられるが、解糖阻止や抗凝固等、分析結果に極めて大きい影響を与えることが知られている変動要因に対して対策が取られているに過ぎない。

【0014】このようなことを考慮すれば、遠心分離は採血直後に行なうことが望ましいが、これは実行されていないことも多い。というのは、血清を検体とする分析法が歴史的に確立されてきたが、血清を得るには最低30分～1時間の放置による凝固反応の完結が必要であること、また、抗凝固剤を添加して遠心分離したとしても、その後の分析機器による測定時間までの間に、検体によってファブリンの析出等が起こることがあり、これが分析機器の分注シリンジやチューブ等の搬送系のトラブルになり易いからである。

【0015】このため、採血後数時間以内には遠心分離して血清検体を得ることが望ましいが、これは病院での検査では可能であっても、検体の移送に時間を要する検査センターでの測定対象とする場合には全くまちまちであり、1日以上経過してから分離されることも頻繁にあるのが実状である。

【0016】一方、ドライケミストリー分析要素は、便利ではあるが反応に必要な全ての試薬を素子の中に組み込むねばならず、用いられる試薬の特性が分析対象項目によって1つづつ異なるので、処方開発及び製造条件の

最適化に多大の労力と時間、設備がかかるという大きな問題点がある。

【0017】また、全ての試薬を含んでいるので、検体を点着後、直ちに反応が進行する。これは検体の採取場所と分析場所が異なったりして検体採取から分析までに時間を要する場合には検体を変質させずに液体のまま保存しなければならないことを意味し、上述した溶液法の場合と同様手間がかかるばかりでなく技術的にも困難ことが多い。さらに、複数の分析項目を分析する場合には、分析項目の数だけ各分析要素に検体を点着しなければならず、これは手間がかかるばかりでなく、必要検体量も多くなりがちである。

【0018】本発明の目的は、微量の液体試料、特に液体試料を分析要素に一回供給するだけで十分な精度で多項目の分析ができ、更に、試料供給後の分析要素を確実に保存・移送できる多項目分析方法を提供することにある。

【0019】

【課題を解決するための手段】本発明の上記目的は、水不浸透性支持体の上に、少なくとも親水性ポリマー層、多孔性展開層がこの順に積層されている、測定試薬を含まない多層分析要素に検体を点着し、乾燥後、少なくとも該多孔性展開層を切断し、その後切断により分画された各部分にそれぞれ異なった検出反応を起こす測定試薬を点着し、測定を行うことを特徴とする多項目分析方法により達成された。

【0020】本発明で用いる多層分析要素の基本構成は、水不浸透性支持体、親水性ポリマー層、血漿受容層として働く多孔性展開層より成る。多孔性展開層は複数の層から成っていても良く、又、この層の上に複数の層から成っていても良い血球分離要素を有しても良い。

【0021】検体として全血を使用する場合には多孔性展開層の上に血球分離要素を設けることが好ましい。血球分離要素としては、特開昭62-138756～8号公報、特開平2-105043号公報、特開平3-16651号公報等に記載された繊維質多孔性層と非繊維質多孔性層を部分的に配置された接着剤で接着（部分接着）一体化したもの、表面が親水化された弗素含有ポリマー、ポリスルホン等の血球分離能を有する微多孔性層等を使用できる。これらの中で特に好ましいものは、血液点着側に繊維質多孔性層を配置し、血漿受容層側に非繊維質多孔性層を配置して両者を部分接着により一体化した血球分離要素である。

【0022】繊維質多孔性層と非繊維質多孔性層を部分的に配置された接着剤で接着（部分接着）一体化した血球分離要素における非繊維質多孔性層としては、特公昭53-21677号、米国特許1,421,341号等に記載されたセルロースエステル類、例えば、セルロースアセテート、セルロースアセテート／ブチレート、硝酸セルロースからなるブラッシュポリマーの層が好ましい。6-ナイロン、

6, 6-ナイロン等のポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレン、テフロン等の表面を親水化した微多孔性膜でもよい。その他、特公昭53-21677号、特開昭55-90859号等に記載された、ポリマー小粒子、ガラス粒子、けい藻土等が親水性または非吸水性ポリマーで結合された連続空隙をもつ多孔性層も利用できる。

【0023】非繊維多孔性層の有効孔径は0.8~30μm、特に0.5~5μmであることが好ましい。本発明で非繊維多孔性層の有効孔径は、ASTM F316-70に準拠した限界泡圧法（バブルポイント法）により測定した孔径で示す。非繊維多孔性層が相分離法により作られたいわゆるブラッシュ・ポリマーから成るメンブランフィルターである場合、厚さ方向の液体通過経路は、膜の製造の際の自由表面側（即ち光沢面）で最も狭くなっているのが普通で、液体通過経路の断面を円に近似したときの径孔は、自由表面の近くで最も小さくなっている。単位の通過経路における厚さ方向に関する最小孔径は、さらにフィルターの面方向について分布を持っており、その最大値が粒子に対するろ（滤）過性能を決定する。通常、それは限界泡圧法で測定される。

【0024】上に述べたように、相分離法により作られたいわゆるブラッシュ・ポリマーから成るメンブランフィルターでは、厚さ方向の液体通過経路は膜の製造の際の自由表面側（即ち光沢面）で最も狭くなっている。本発明の分析要素の非繊維多孔性層としてこの種の膜を用いる場合には、支持体に近い側、即ち血漿受容層に面する側に、メンブランフィルターの光沢面を向けることが好ましい。

【0025】繊維質多孔性層を構成する材料としては、遠紙、不織布、織物生地（例えば平織生地）、編物生地（例えば、トリコット編）、ガラス繊維遠紙等を用いることができる。これらのうち織物、編物等が好ましい。織物、編物等は特開昭57-66359号に記載されたようなグロー放電処理をしてもよい。

【0026】繊維質多孔性層は、液体試料の展開層として利用されるので、液体計量作用を有する層であることが好ましい。液体計量作用とは、その表面に点着供給された液体試料を、その中に含有している成分を実質的に偏在させることなく、面の方向に単位面積当たりほぼ一定量の割合で広げる作用である。展開層には、展開面積、展開速度等を調節するため、特開昭60-222770号、特開昭63-219397号、63-112999号、62-182652号に記載したような親水性高分子あるいは界面活性剤を含有してもよい。

【0027】繊維質多孔性層の空隙体積（単位面積当たり。以下同じ）は非繊維多孔性層と同じでもよいし、異なってもよい。両者の空隙体積の関係を調整するには、両者の空隙率または厚さを変えてよいし、厚さと空隙率の両方を変えてよい。

【0028】表面が親水化された弗素含有ポリマー、ボ

リスルホン等の微多孔性層は、実質的に分析値に影響を与える程には溶血することなく、全血から血球と血漿を特異的に分離するので、繊維質多孔性層と組み合わせることなく単独でも、血球分離要素の材料として使用することができる。その血球・血漿分離機構は明らかでないが、この微多孔性層はその表面のみで血球をトラップする訳ではなく、弗素含有ポリマーからなる微多孔性層と多孔性展開層をあわせた厚さ方向に浸透するに従って、初めは大きな血球成分、後には小さな血球成分と徐々に空隙構造にからめ、厚さ方向の全長にわたって血球を留め除去していく、いわゆる体積濾過作用によるものと思われる。

【0029】弗素含有ポリマーとしては、ポリビニリデンフルオリドやポリテトラフルオロエチレンなどがあり、ポリテトラフルオロエチレンが好ましい。弗素含有ポリマーからなる微多孔性層の微孔のサイズは、約0.2μmから約60μm、好ましくは約0.5μmから約20μmの範囲、更に好ましくは0.5~5μmの範囲、空隙率は約40%から約95%、好ましくは約50%から約80%の範囲、層の厚さは約10μmから約200μm、好ましくは約30μmから約150μm、製造工程中でのしわ発生等の取り扱い性を考慮すると、最も好ましくは約50μmから約120μmの範囲である。

【0030】弗素含有ポリマーの微多孔性層は特開昭57-66359(US 4783315)に記載の物理的活性化処理（好ましくはグロー放電処理又はコロナ放電処理）を微多孔性層の少なくとも片面に施すことにより微多孔性層の表面を親水化して、隣接する微多孔性展開層との部分接着に用いられる接着剤の接着力を強化することができる。

【0031】これらの弗素含有ポリマーの微多孔性層としては、特表昭63-501594(WO 87/02267)に記載のポリテトラフルオロエチレンのフィブリル（微細繊維）からなる微多孔性のマトリックス層（微多孔性層）、Gore-Tex (W. L. Gore and Associates社製)、Zite x (Norton社製)、ボアフロン（住友電工社製）などがある。

【0032】孔径（微孔のサイズ）約0.1μmから約50μm、層の厚さは約20μmから約400μmである。

【0033】構造としては、延伸しないもの、1軸延伸したもの、2軸延伸したもの、1層構成の非ラミネートタイプ、2層構成のラミネートタイプ、例えば繊維等の他の膜構造物にラミネートした膜等がある。その他に、US 3368872、US 3260413、特開昭53-92195(US 4201548)等に記載のポリテトラフルオロエチレンの微多孔性膜、US 3649505に記載のポリビニリデンフルオリドの微多孔性膜などがある。

【0034】これらの弗素含有ポリマーの微多孔性膜のうち、血球分離要素を構成する微多孔性層に特に適しているのは、孔径が実質的に赤血球を通さない程度に小さく、膜厚が薄く、空隙率が高いものである。具体的に

は、孔径が0.5~5 μm、膜厚10~200 μm、空隙率が少なくとも70%以上有る膜が好ましい。

【0035】フィブリル構造又は一軸延伸もしくは二軸延伸した非ラミネートタイプの微多孔性膜は延伸により、空隙率が大きくかつ滻過長の短い微多孔膜が作られる。滻過長が短い微多孔膜では、血液中の有形成分（主として赤血球）による目詰りが生じがたく、かつ血球と血漿の分離に要する時間が短いので、定量分析精度が高くなるという特徴がある。

【0036】これらの弗素含有ポリマーの微多孔性膜の作成に当たっては、1種もしくは2種以上の弗素含有ポリマーを混合しても良いし、弗素を含まない1種もしくは2種以上のポリマーや繊維と混合し、製膜したものであっても良い。

【0037】弗素含有ポリマーの微多孔性膜は、そのままでは表面張力が低く分析要素の血球滻過層として用いようとしても、水性液体試料ははじかれてしまって膜の表面や内部に拡散、浸透しないことは周知の事実である。弗素含有ポリマーの微多孔性膜に親水性を付与し親水性を高める手段としては、微多孔性膜の外部表面及び内部の空隙の表面を実質的に親水化するに充分な量の界面活性剤を弗素含有ポリマーの微多孔性膜に含浸させる方法、弗素樹脂膜の構造中にカルボニル基や水酸基を化学的に導入する等、公知の方法が挙げられる。

【0038】水性液体試料がはじかれることなく膜の表面や内部に拡散、浸透、移送されるに充分な親水性を弗素含有ポリマーの微多孔性膜に付与するには、一般に弗素含有ポリマーの微多孔性膜の空隙体積の約0.01%から約10%、好ましくは約0.1%から約5.0%、更に好ましくは0.1%から1%の界面活性剤で微多孔性膜の空隙の表面が被覆することが必要である。例えば、厚さが50 μmの弗素含有ポリマーの微多孔性膜の場合に、含浸される界面活性剤の量は、一般に0.05g/m²から2.5g/m²の範囲であることが好ましい。弗素含有ポリマーの微多孔性膜に界面活性剤を含浸させる方法としては、界面活性剤の低沸点（沸点約50°Cから約120°Cの範囲が好ましい）の有機溶媒（例、アルコール、エステル、ケトン）溶液に弗素含有ポリマーの微多孔性膜を浸漬し、溶液を微多孔性膜の内部空隙に実質的に充分に行きわらせた後、微多孔性膜を溶液から静かに引き上げ、風（温風が好ましい）を送り乾燥させる方法が一般的である。血球滻過層を構成する微多孔性層に含有させる前処理試薬等の成分とともに界面活性剤を弗素含有ポリマーの微多孔性膜に含有させることもできる。

【0039】弗素含有ポリマーの微多孔性膜を親水性化処理に用いられる界面活性剤としては、非イオン性（ノニオン性）、陰イオン性（アニオン性）、陽イオン性（カチオン性）、両性いずれの界面活性剤をも用いることができる。これらの界面活性剤のうちでは、ノニオン性界面活性剤が、赤血球を溶血させる作用が比較的低い

ので、全血を検体とするための多層分析要素においては有利である。ノニオン性界面活性剤としては、アルキルフェノキシポリエトキシエタノール、アルキルポリエーテルアルコール、ポリエチレングリコールモノエステル、ポリエチレングリコールジエステル、高級アルコールエチレンオキシド付加物（縮合物）、多価アルコールエステルエチレンオキシド付加物（縮合物）、高級脂肪酸アルカノールアミドなどがある。

【0040】ノニオン性界面活性剤の具体例として、次のものがある。アルキルフェノキシポリエトキシエタノールとしては、

イソオクチルフェノキシポリエトキシエタノール：（Triton X-100：オキシエチレン単位平均9~10含有）

（Triton X-45：オキシエチレン単位平均5含有）

ノニルフェノキシポリエトキシエタノール：（IGEPAL CO-630：オキシエチレン単位平均9含有）

（IGEPAL CO-710：オキシエチレン単位平均10~11含有）

（LENEX 698：オキシエチレン単位平均9含有）

アルキルポリエーテルアルコールとしては、

高級アルコール ポリオキシエチレン エーテル：（Triton X-67：CA Registry No. 59030-15-8）

【0041】弗素含有ポリマーの微多孔性膜は、その多孔性空間に水不溶化した1種又は2種以上の水溶性高分子を設けることによって親水化したものであってよい。水溶性高分子の例として、酸素を含む炭化水素にはポリビニルアルコール、ポリエチレンオキサイド、ポリエチレングリコール、メチセルロース、エチセルロース、ヒドロキシエチセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、窒素を含むものにはポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアミン、ポリエチレンイミン、負電荷を有するものとしてポリアクリル酸、ポリメタアクリル酸、ポリスチレンスルホン酸などをあげることが出来る。不溶化は熱処理、アセタール化処理、エステル化処理、重クロム酸カリによる化学反応、電離性放射線による架橋反応等によって行えばよい。詳細は、特公昭56-2094号公報及び特公昭56-16187号公報に開示されている。

【0042】ポリスルホンの微多孔性膜は、ポリスルホンをジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドンあるいはこれらの混合溶媒等に溶解して製膜原液を作製し、これを支持体上に、又は直接凝固液中に流延し洗浄、乾燥して行うことにより製造することができる。詳細は特開昭62-27006号公報に開示されている。

ポリスルホンの微多孔性膜は、そのほか特開昭56-12640号公報、特開昭56-86941号公報、特開昭56-154051号公報等にも開示されており、それらも使用することができる。ポリスルホンの微多孔性膜も弗素含有ポリマーと同様界面活性剤を含有させ、あるいは水不溶化した水溶

性高分子を設けることによって親水化することができる。

【0043】表面が親水化された弗素含有ポリマー、ポリスルホン等の微多孔性層は単一で血球分離要素として使用することもできるが、前述の繊維質多孔性層を組み合わせることにより、血球分離能をさらに高めることができる。

【0044】血球分離要素で分離された血漿の受容層として働く多孔性展開層は、水性の検体に含有されている成分を実質的に偏在させることなしに平面的に拡げ、単位面積当たりほぼ一定量の割合で親水性ポリマー層に供給する機能を有する層である。多孔性展開層を構成する材料としては、軟化点が50~300℃程度、好ましくは60~250℃程度の熱可塑性樹脂が好ましい。好ましい熱可塑性材料としては、セルロースエステル類、例えばセルロースアセテート、セルロースアセテート／ブチレート、硝酸セルロース等、ポリオレフィン類、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン等、各種ナイロン等のポリアミド類、ポリエチレンテレフタレート等のポリエステル類、等を挙げることができる。具体的には、これまでドライケミストリー分析要素に使われている展開層として公知の、非繊維質及び繊維質の多孔性材料の中から適宜選択して用いることができる。例えば、特開昭49-53888に開示されているメンブランフィルター（ラッシュドポリマー）に代表される非繊維性等方的微多孔質媒体層、特開昭55-90859等に開示されたポリマーミクロビーズが水不膨潤性の接着剤で点接触状に接着されて成る連続空隙含有三次元格子粒状構造物層に代表される非繊維性多孔性層、特開昭55-164356、同57-66359等に開示された織物布地からなる多孔性層、同60-222769等に開示された編物布地からなる層、各種の疊紙等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。多孔性展開層は、後述する溶断が可能な範囲で熱可塑性を有しない材料、例えば、酸化チタン、硫酸バリウム等を含むことができる。

【0045】又、既述の表面が親水化された弗素含有ポリマーの微多孔性膜等も使用することができる。

【0046】多孔性展開層は、1層だけに限定する必要はなく、特開昭61-4959、同62-138756、同62-135757、同62-138758等に開示されていてる様に、2層以上の層を重ねて用いることができる。展開層を2層以上重ねた多層分析要素については、検体の点着時には全層が積層一体化されている構成をとることが必須であるが、その後のプロセスでは一体化されている必要はない。必要に応じて、第一の展開層と第二の展開層の間を剥離した状態で使用することができる。

【0047】展開層中には、検体の展開を促進するために、ノニオン、アニオン、カチオンもしくは両性の界面活性剤を含ませることができる。また、展開性をコントロールする目的で、親水性のポリマー等の展開制御剤を

含ませることができる。更に、目的とする検出反応を促進する為の、あるいは干渉、妨害反応を低減、阻止する為の各種試薬、もしくは試薬の1部を含ませることができる。展開層の厚さは、20~200μm、好ましくは50~170μm、更に好ましくは80~150μmである。

【0048】本発明で用いる分析要素は、分析項目等によっては上記の多孔性展開層が単に水不浸透性支持体に積層されているだけでもよいが、多孔性展開層と支持体の間に親水性ポリマー層を設けることによって分析項目等の普遍性を飛躍的に高めることができる。

【0049】親水性ポリマー層には、これまでドライケミストリー分析要素に使われている公知の水に可溶性、膨潤性、親水性の各種ポリマーを用いることができる。水吸収時の膨潤率が30℃で約150%から約2000%、好ましくは約250%から約1500%の範囲の天然又は合成親水性ポリマーを使用することができ、具体的には、特開昭59-171864、同60-108753等に開示されたゼラチン（例えば、酸処理ゼラチン、脱イオンゼラチン等）、ゼラチン誘導体（例えば、タル化ゼラチン、ヒドロキシアクリレートグラフトゼラチン等）、アガロース、ブルラン、ブルラン誘導体、ポリアク릴アミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルビロリドン、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ポリヒドロキシプロビルアクリレート、又はこれらを含む共重合体等を挙げることができが、これらに限定されるものではない。

【0050】親水性ポリマー層に代えて、親水性表面を有する紙やポリマー多孔質膜を用いることもできる。親水性ポリマー層の厚さは、乾燥時に約1μm~約100μm、好ましくは約3μm~約50μm、特に好ましくは約5μm~約30μmであり、実質的に均一な構造であることが好ましい。親水性ポリマー層中には、目的とする反応を促進する、もしくは干渉、妨害反応を防止、低減するための各種試薬もしくは試薬の1部を含ませることができる。

【0051】水不浸透性支持体としては、これまでドライケミストリー分析要素に使われている公知の水不浸透性の支持体を用いることができる。具体的には、ポリエチレンテレフタレート、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、セルロースエステル（例えば、セルロースジアセテート、セルローストリニアセテート、セルロースアセートプロピオネート等）等から成る厚さ約50μm~1mm、好ましくは約80μm~約300μmの透明フィルムを用いることができる。

【0052】支持体は、通常光透過性のものを用いるが、展開層側から測定をする場合には、着色されていても、もしくは光不透過性であっても良い。支持体の表面には、必要により公知の下塗層もしくは接着層を設けて、親水性ポリマー層との接着を強固にすることができます。

【0053】ここで、本発明で使用する分析要素の一つ

の特徴である部分接着（多孔性接着）について説明する。部分接着とは、特開昭61-4959（E P 0166365 A）、特開昭62-138756～138758（E P 0226465 A）等に記載の、2つの隣接する多孔性層同士又は隣接する多孔性層と非孔性層との接着の態様であって、『隣接する2層の界面の間に部分的（又は断続的）に配置された接着剤によって実質的に密着され一体化されており、かつ前記隣接する2面及びその間において液体の一様通過が実質的に妨げられないように構成されている接着』である。

【0054】本発明で使用する分析要素においては、血球分離要素における纖維質多孔性層と非纖維質多孔性層の間、血球分離能を有する微多孔性層と纖維質多孔性層の間及び血球分離要素と多孔性展開層の間はいずれも部分接着（多孔性接着）されていることが好ましい。例えば、多孔性展開層と血球分離要素の間を接着する場合には、接着剤を多孔性展開層に部分的に配置し、ついで血球分離要素を一様に軽く圧力を加えながら貼りあわせるのが一般的な方法である。逆に血球分離要素に接着剤を部分的に配置し、ついで多孔性展開層を一様に軽く圧力を加えながら貼りあわせることもできる。さらに、多孔性展開層にする微多孔性シート状物に接着剤を部分的に配置し、これに血球分離要素を一様に軽く圧力を加えながら貼りあわせ、あるいは逆に血球分離要素に接着剤を部分的に配置し、ついで、多孔性展開層にする微多孔性シート状物を一様に軽く圧力を加えながら貼りあわせた後に、親水性ポリマー層に展開層にする微多孔性シート状物を一様に貼りあわせることもできる。

【0055】接着剤を血球分離要素又は多孔性展開層に部分的に配置する方法は特開昭61-4959、特開昭62-138756、特開昭64-23160（D E 3721236 A）等に記載の諸種の方法によることができる。それらの諸方法のうちでは印刷法による方法が好ましい。印刷法のうちで、接着剤を印刷版（グラビア印刷版又は凹版が好ましい）ローラーを用いて多孔性展開層又は血球分離要素に転写し付着させる方法及び隣接する2層を貼りあわせる方法は、例えば、日本印刷学会編『印刷工学便覧』（技報堂出版（株）、1983年）839～853頁等に記載の公知の装置及び方法により実施することができる。

【0056】用いられる接着剤としては特開昭62-138756に記載の諸種の接着剤、そのほか前記の『印刷工学便覧』839～853頁等に記載の公知の接着剤を用いることができる。接着剤としては水溶媒型の接着剤、有機溶剤型の接着剤、熱接着性（又は感熱性）接着剤を用いることができる。水溶媒型の接着剤の例として、澱粉糊等の水性の糊；デキストリン、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール等の水溶液；酢酸ビニル-ブチルアクリレート共重合体エマルジョンがある。有機溶剤型の接着剤としては、溶剤の蒸発の遅いものが適する。熱接着性（又は感熱性）接着剤は特に有用である。

【0057】熱接着性（又は感熱性）のホットメルト型接着剤としては、「工業材料」26巻（11号）4～5頁等に記載のホットメルト型接着剤を用いることができる。その例として、エチレン-酢酸ビニル共重合体、エチレン-アクリル酸エチル共重合体、エチレン-アクリル酸共重合体等のエチレン共重合体；低分子量ポリエチレンやアタクチックポリプロピレンのようなポリオレフィン類；ナイロン等のポリアミド；ポリエステル系共重合体；SBSなどのステレンブロック共重合体のような熱可塑性ゴム；ステレンブタジエンゴム、ブチルゴム、ウレタンゴム；ロジン、石油樹脂、テルペン樹脂；合成ワックスがある。これらの中で、シリコーン系、アクリル系、フェノール樹脂系の感圧型接着剤が、本発明において特に有用である。

【0058】更に、検体を点着後に血球分離要素を剥離除去する態様においては、展開層と血球分離要素とは接着されている必要は無く、検体の拡散・浸透が定量的に進行するよう積層されていれば良いが、均一拡散を確実にするために部分接着を行なう方が好ましい。

【0059】本発明の分析方法においては、まず測定試薬を含まない多層分析要素に検体を点着して検体を十分に拡散展開させ、血球分離要素があるときには好ましくはこれを剥離し、多層分析要素を乾燥し、試薬を点着する前に、少なくとも多孔性展開層を切断し、切断により分画された各部分にそれぞれ異なった検出反応を起こす測定試薬を点着し、測定を行うことを特徴としている。

【0060】検体は全血、血漿、血清等であり、点着量は15～50μl程度でよい。点着後は検体の拡散展開のため30秒～1分程度放置する。

【0061】乾燥は、乾燥剤が存在する密閉容器内で40℃以下で、被検物質が変性し易い場合には25℃以下、酵素の様に不安定な化合物の場合には10℃以下、好ましくは0℃以下で乾燥することが好ましい。この密閉容器には水、水蒸気等の不浸透性のプラスチック製の袋を用いることができる。具体的には、分析要素をファスナー付きのビニール袋、蓋付きのプラスチック容器等に乾燥剤と共に封入して上記温度以下に保つ。少なくとも点着後1時間は25℃以下に保つことが好ましい。乾燥剤は公知の吸湿剤の中から被検物質を実質的に変質させないものを適宜選択して用いれば良いが、安全性、脱水能力等からゼオライト、シリカゲルが好ましく、ゼオライトがより好ましい。ゼオライト又はシリカゲル1g当り多層分析要素を少なくとも4枚程度（上限は10枚程度）乾燥できる。形態としては、直径1～3mm程度の粒子を透湿性の良い袋、例えばポリエステル不織布製の袋、ナイロンメッシュ製の袋等に入れる、等を挙げることができる。乾燥時間は点着された液体試料の量・種類、乾燥剤の種類・形状・容器の大きさ・分析要素との位置関係等によって異なる。通例1～10時間程度、特に1～3時間程度で分析要素の水分の90%以上が乾燥剤により除去・脱水

されるような条件を設定することが実用上好ましい。この乾燥時間は温度によっても大きく影響される。保存温度が高いほど、即ち蒸気圧が高い程、乾燥時間は短くて良い。また、冷蔵庫もしくは冷凍庫に放置して一度低温に保った後1℃以上にして乾燥することもできる。この低温乾燥法は、被検物質が酵素の場合にその変性劣化を防止できるので特に有用である。

【0062】他の好ましい乾燥方法としては、特開平3-28954号公報の第25頁第9行～第28頁第6行、特に第27頁第13行～第28頁第6行に詳細に記載されている、インキュベーションを挙げることができる。

【0063】この方法においては、検体が点着された分析要素を、好ましくは、周囲が覆われた囲いの中に置いた状態で加熱する。これにより、周囲の温度、湿度に影響されることなく一定の乾燥状態となる。温度範囲は10～60℃、好ましくは20～50℃、更に好ましくは30～45℃である。インキュベーション中の温度変動は±5℃、好ましくは±3℃、更に好ましくは±1℃である。

【0064】この様な一定条件のインキュベーションを行うのに適したインキュベータが実開平3-126499号公報に記載されている。即ち、分析要素を要素の収納部に設置した状態で加温手段にて加熱後、恒温に保持するインキュベータであって、該分析要素の収納部の上部に該要素収納部を密閉することが可能で、かつ、着脱可能なカバーを設けられ、該カバーで要素収納部を密閉した際、要素収納部内方に生まれる空間の体積が、分析要素の体積とほぼ一致する様に設計されたインキュベータである。一定温度の乾燥風を一定条件で吹き付けても同様に再現性の良い結果が得られるが、上記インキュベータに比べ高価となる欠点を有する。

【0065】インキュベーション法においては、安定化させた後、測定試薬を供給するまでに長時間かかる場合、例えば分析要素を病院等に郵送する場合等には、実質的に水分と空気を遮断した状態に保存する必要がある。

【0066】この保存条件の詳細についても同様に、特開平2-289543号公報の第28頁第12行～第30頁第11行に記載されている。例えば水分除去手段を設けた金属製の箱、もしくは水分を透過させない有機ポリマーもしくは金属等のフィルム、シート等からなる袋に密閉する方法がある。

【0067】水分除去手段としては、公知の吸湿剤の中から検体を実質的に変質させないものを適宜選択して封入することができる。分析要素を袋に入れた後、空気を十分にしごきだしても良い。

【0068】上記の、乾燥剤が存在する密閉容器内で乾燥した場合には、そのままの状態で保存・移送をすることができる。

【0069】ここで、「乾燥」とは、該親水性ポリマー中で実質的に反応が進行しない、もしくは被検物質の劣化が進行しない、状態であれば良い。従って、分析対象

によって異なり、例えば酵素を対象とする場合には、親水性ポリマー中の水分は20%以下、好ましくは10%以下、更に好ましくは5%以下であれば良い。ここで、水分の%は、被検物質を含む水溶液を分析要素に点着した時の水分量を100とした時の比率である。

【0070】次に、検体が点着され、乾燥・安定化された分析要素を密閉容器から取り出し、血球分離要素があるときはこれを剥離除去して、分画を行う。分画は、引き続き点着する複数の測定試薬の混合に起因する、測定精度の低下を防止することを目的とする。

【0071】分画は、下記の方法を適宜選択することにより行う。

1. 少なくとも多孔性展開層を軟化点以上の温度に加熱し、熱溶断する。
2. 濡水性の化合物を用いる。
3. 通常の刃物を用いて切り放す。

以下に、それぞれの方法について述べる。

【0072】本発明の方法における熱溶断溝は、溶断において多孔構造を熱融着を起こさせて破壊し、少なくとも多孔性展開層における該溶断溝を越えた測定試薬の展開を阻止するものである。従って、この熱溶断溝は一つの多層分析要素を複数区画に仕切るものであり、形状としては通常は略同形に、2～16等分程度、好ましくは2～9等分程度、特に好ましくは2～4等分程度にする。熱溶断溝を形成する方法としては、分画する数に応じた形状の、例えば4分画する場合には十文字型の、黄銅製の刃を電気等を用いて加熱する、アルミニウム製の刃を超音波発振装置に取り付けて振動エネルギーにより熱可塑性樹脂の温度を上げる、等が挙げられる。加熱された直刃、回転刃等を用いて十文字に溶断することもできる。いずれの場合も、刃の厚さは0.4～2mm、好ましくは0.6mm～1.7mm、より好ましくは0.8～1.3mm程度である。刃が薄いと切断面の間隔が十分ではなく、厚すぎると熱可塑性樹脂の塊が残ることがあり好ましくない。

【0073】場合によつては、多孔性展開層の熱溶断のみでは親水性ポリマー層を介して測定試薬が展開し、測定精度を下げることがある。この際には、多孔性展開層及び親水性ポリマーの軟化点以上の温度に上げて、多孔性展開層から支持体に達する溶断溝を設ける。

【0074】濡水性の化合物を用いる分画としては以下の方法が挙げられる。濡水性化合物としては、シリコーン、弗素化合物、等の他、一般に知られる不揮発性の有機化合物を用いることができる。これらの化合物は、水又は有機溶媒に分散・溶解等されていても良く、グラビア印刷、シルクスクリーン印刷、筆を用いて塗る、細いチューブの先端から押し出す等の方法により、展開層を処理する。この時重要なのは、これらの疎水性化合物が単に該展開層の表面のみを疎水化するのではなく、厚み方向及び幅方向に十分な量が浸透していることであり、化合物や溶液の粘度を選択する。幅は0.1～2mm、好ま

しくは0.5~1mmである。

【0075】刃物を用いる分画は通常の切断を行う方法で良い。この場合は、水不浸透性支持体まで切断することも可能である。

【0076】撥水性の化合物を用いる分画、刃物を用いる分画は、多孔性展開層として弗素含有化合物等の、熱溶断が容易ではない素材を用いる時に特に有用である。

【0077】これらの分画された分析要素を用いて、以下の方法により分析を行う。分析要素の分画された各区画に、分析すべき項目に対応した測定試薬溶液(2~10μl程度)を供給して反応を起こさせる。この反応を、ドライケミストリーの分野で公知の方法(反射濃度測光、色変化、蛍光測定、発光測定等)で測定し、検体中に含まれる成分を定量する。

【0078】分析すべき項目に対応した測定試薬溶液としては、ウェットケミストリーで公知の試薬溶液を用いることができる。これらは分析対象成分と反応して、主として光学的測定方法により検出できる変化、例えば色変化、発色(呈色)、蛍光、発光、紫外線領域における吸収波長の変化、混濁発生等の変化を生じさせる。

【0079】ドライケミストリーの測定法としては、通常反射光学系が用いられる。本発明の方法においても、分析要素の水不浸透性支持体を通して測光する方法が最も適用範囲が広いが、検体が全血ではない場合や検体供給後に血球分離要素を除去して測定する場合には、透過測光方式により測定することができる。また、水不浸透性支持体が不透明な場合には、支持体の反対側から測定することもできる。

【0080】次に、被検物質について説明する。本願発明においては、対象とする被検物質は特に限定されない。通常臨床検査の分野で測定される酵素、脂質、無機イオン、代謝産物、蛋白質等の他、各種グロブリン、免疫抗原、免疫抗体等の生体由来成分、薬物、ホルモン、腫瘍マーカー、DNA、RNA等、分析方法さえ確立していれば、分析対象とすることができます。

【0081】本発明において使用する分析要素は、測定の対象となる項目もしくは検体によって、以下に記載する種々の構成を取ることができる。

【0082】1: 水不浸透性支持体/親水性ポリマー層/展開層なる構成の分析要素。

血漿・血清・尿等、赤血球等の強く着色した粒子成分を多量に含有しない検体溶液を対象とする。又は、赤血球やヘモグロビンそのものを分析対象とする場合に有効である。

【0083】2: 水不浸透性支持体/親水性ポリマー層/展開層/血球分離要素なる構成の分析要素。

血球分離要素を有する分析要素は、全血等の様に着色粒子を含んだ体液を検体とする分析の場合に有効である。GOT(グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ)、GPT(グルタミン酸ビルビン酸トランスアミナ

ーゼ)、γ-GTP(γ-グルタミルトランスペプチダーゼ、略号GGT)、グルコース、LDH(乳酸脱水素酵素)、CPK(クレアチニンホスホキナーゼ)、TP(総蛋白質)、Alb(アルブミン)、TCO(総コレステロール)、UA(尿酸)、BUN(尿素窒素)、中性脂肪、Na、K、Ca、Cl、P、Mg等の無機イオン等を対象項目とする分析に有効である。

【0084】3: 水不浸透性支持体/親水性ポリマー層/展開層/血球分離要素なる構成で、親水性ポリマー層及び/又は展開層中に色原体を含む分析要素。

色原体としては、Ann. Clin. Biochem., 6, 24~27(1969)に記載の4-アミノアンチビリン(別名4-アミノフェナゾン、すなわち1-フェニル-2,3-ジメチル-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン)、特開昭59-54962等に記載の1-(2,4,6-トリクロロフェニル)-2,3-ジメチル-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン、1-(3,5-ジクロロフェニル)-2,3-ジメチル-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン等のトリ置換-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン、特公昭55-25840等に記載の1-フェニル-2,3-ジメチル-4-ジメチルアミノ-3-ピラゾリン-5-オン等の4-アミノアンチビリン類似体を用いることができる。これらの化合物のうちでは、4-アミノアンチビリン、1-(2,4,6-トリクロロフェニル)-2,3-ジメチル-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン、1-(3,5-ジクロロフェニル)-2,3-ジメチル-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン等が好ましい。

【0085】4: 水不浸透性支持体/親水性ポリマー層/展開層/血球分離要素なる構成で、親水性ポリマー層及び/又は展開層中に、色原体及びその他の試薬(後述する、測定試薬を除く)を含む分析要素。

その他の試薬としては、POD(ペルオキシダーゼ)、NAD(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)、NADP(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート)、DIP(ジアフォラーゼ)等が挙げられる。

【0086】上記3及び4の構成において、色原体もしくはその他の試薬は、液体試料を供給・安定化後に供給することが可能だが、色原体の多くは水不溶性のため測定試薬とは別に供給する必要があること、これら色原体やその他試薬を層の中に初めから含ませて製造する方が再現性が良いこと等の利点がある。

【0087】5: 媒染層を含む分析要素。

呈色試薬がイオン性染料を形成する場合には、水不浸透性支持体と試薬層との間に媒染層を設けることができる。検体中の被検物質の量に比例して生成する色素を媒染層に移行・トラップすることにより、光学的な検出の効率を高めることができる。

【0088】例えば、呈色色素がカチオン性の染料を形

成する場合には、媒染層として高分子鎖に結合したアニオン原子もしくは原子団を含むポリマーを含有する親水性ポリマー層を、また呈色試薬がアニオン性の染料を形成する場合には、媒染層として高分子鎖に結合したカチオン原子もしくは原子団を含むポリマーを含有する親水性ポリマー層を用いることができる。

【0089】これらの媒染性ポリマーの詳細については特公平2-30466、特開昭51-40191、同54-29700、同53-131089等に記載されている。例えば、アニオン媒染性高分子としては、特公平2-30466号公報第13~14欄に記載されているメチルビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体のアルカリ加水分解物、ポリスチレン-p-スルホン酸のアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩、スチレン-p-スルホン酸と親水性ビニルモノマーとの共重合体のアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩等が挙げられる。更に、これらの高分子を含有させることのできる層等についても、同公報の第15~16欄に詳細な記載がある。

【0090】6: 上記1~5の構成において、親水性ポリマー層と展開層の間に、光遮蔽層を設けた分析要素。血球分離要素を除去しなくとも全血を検体とすることができる。光遮蔽層は、光遮蔽性又は光反射性と兼ね備えた微粒子又は微粉末（以下、単に微粒子という）が少量の被膜形成能を有する親水性ポリマーバインダーに分散保持されている水透過性又は水浸透性の層である。光遮蔽層は検出可能な変化（色変化、発色等）を光透過性支持体側から反射測光する際に、供給された水性液体試料の色、特に全血試料に含まれるヘモグロビンの赤色等を遮蔽するとともに光反射層又は背景層としても機能する。

【0091】光遮蔽性と光反射性とを兼ね備えた微粒子の例として二酸化チタン微粒子（ルチル型、アナターゼ型又はブルカイト型の粒子径約0.1μmから約1.2μmの微結晶粒子等）、硫酸バリウム微粒子、アルミニウム微粒子又は微小フレーク等があり、光遮蔽性微粒子の例としてカーボンブラック、ガスブラック、カーボンミクロビーズ等があり、これらのうちで二酸化チタン微粒子、硫酸バリウム微粒子が好ましい。

【0092】被膜形成能を有する親水性ポリマーバインダーとしては、前記親水性ポリマーのほかに弱親水性の再生セルロース、セルロースアセテート等があり、これらのうちではゼラチン、ゼラチン誘導体、ポリビニアルコール、ポリアクリルアミド、マレイン酸共重合体等が好ましい。ゼラチン、ゼラチン誘導体は公知の硬化剤（架橋剤）を混合して用いることができる。

【0093】7: 上記1~5の構成において、親水性ポリマー層と展開層の間に、水不浸透性で且つ気体透過性の層（以下、バリア層と称する）を設けた分析要素。反応によりアンモニアガスを発生するBUN（尿素窒素）、CRE（クレアチニン）、及びCO₂等の分析に

有効である。全血・血漿のいずれも、検体として使用できる。バリア層としては、特開昭52-3488に開示された一様なポリマーの塗布層、同58-77661に開示されたメンブランフィター等を使用することができる。

【0094】本発明の方法においては、1つの分析要素の上に検体を点着した後、複数の区画に分画するのであるから、上記1~7の構成の異なる分析要素を測定項目に合わせて混合して使用することはできない。このため、分析対象項目が同じでも、異なる反応系を利用することがある。例えば、同じBUNを測定する場合でも、2の構成の分析要素を用いるときと、7の構成の分析要素を用いる場合とでは、異なる処方の測定試薬を使用する。

【0095】本発明において、測定試薬とは、分析対象である被検物質と直接反応して化学変化を生ぜしめる試薬を指す。即ち、酵素が被検物質である場合にはその基質、被検物質が抗原（抗体）である場合には抗体（抗原）であり、被検物質が脂質、糖、代謝産物であって酵素によって検出可能な変化を生ずる化合物である場合にはその酵素である。また、これらの反応が酵素以外の化学試薬による一般的な化学反応によって起こされる場合には該当する化学物質を言う。以下に具体例を挙げて説明する。

【0096】被検物質が酵素であるGOTの場合には、その基質であるアスパラギン酸とα-ケトグルタル酸、アミラーゼであれば高分子量の澱粉もしくは低分子量のオリゴサッカライド、GGTであればL-アーグルタミルバラニトロアニリド、ALPであればバラニトロフェニルフオスフェートである。

【0097】また、グルコースであればグルコースオキシダーゼ、尿酸であればウリカーゼ、コレステロールであればコレステロールエステラーゼもしくはコレステロールオキシダーゼ、中性脂肪であればリバーゼもしくはエステラーゼ、尿素であればウレアーゼ等である。

【0098】分析対象が蛋白質、アルブミン、Ca、無機リン等、被検物質と指示薬等とが直接反応して検出可能な変化を生ずる場合には指示薬を指す。

【0099】本発明の目的の一つは、従来のドライケミストリーの欠点である、分析要素の保存中に起こる検出試薬の劣化を起こさせないことにあるので、上記の反応系中に組み込まれる反応試薬が酵素のように不安定なものである場合には、これらも測定試薬の中に含ませることが好ましい。

【0100】即ち、測定試薬溶液中に含めるべき試薬と、分析要素中に含めるべき試薬との分配に関しては、分析性能や保存安定性を指標として様々に変えることができる。分析対象が一つであっても、検出反応系組立によつて上記の分配が異なるのは勿論である。

【0101】測定試薬の中には、反応を安定に再現性良く進行させるために、pHやイオン強度を調節する、分

析要素を構成する材料への拡散・浸透を良くする、含有する酵素等の不安定性を改善する、等の目的で各種試薬を含ませることができる。

【0102】また、測定試薬の中には検出反応と競合する反応を阻害するための試薬を含ませることもできる。この様な試薬としては、例えば、ビリルビンオキシダーゼやアスコルビン酸オキシダーゼ等がある。更に、アイソザイム検出の為に特定の生物に由来する酵素を阻害する化合物、例えばP型アミラーゼの阻害剤等を含ませることができる。更に、全血測定では、ヘモグロビンのカラーゼ活性の阻害剤として有効なNaN₃等を添加することもできる。

【0103】本発明の分析要素を用いた測定方法の一例を図1に示す。同図に示すように、この分析要素には多孔性展開層の上に血球分離要素を有するものが用いられており、該分析要素は4隅に分析要素の固定片を有するプラスチックマウントに収容されている。被検者等が採血して分析要素の血球分離要素の上に点着し、血漿が多孔性展開層に充分に展開するのを待つ。次いで、血球分離要素を剥離除去し、乾燥剤が存在する密閉容器内で所定の温度で乾燥し、測定機器が設置されている場所に移送する。そこでは分析要素を取り出して、まず既述の方法により熱溶断溝を形成して4つに区分する。この分析要素をアナライザーの点着ステーションに設置し、各区画に測定試薬を点着する。図面では4つの区画にグルコース、尿素窒素、コレステロール及び尿酸測定試薬をそれぞれ点着している。点着が終了したら分析要素を設置しているテーブルを1/4回転させ、インキュベータ部で反応させる。その間点着ステーションには次の分析要

脱イオンゼラチン

p-ノニルフェノキシポリグリシドール
(平均10グリシドール単位含有)

ビス[(ビニルスルホニルメチルカルボニル)アミノ]メタン

20g

1.5g

次にこの層の上に下記の成分から成る接着層を乾燥後の厚さが1μmになるように水溶液から塗布し、乾燥させ

脱イオンゼラチン

p-ノニルフェノキシポリグリシドール
(平均10グリシドール単位含有)

次に接着層の上に約30g/m²の割合で水を供給して全面をほぼ一様に湿潤させ、PET製プロード織物布地(厚さ約150μm、空隙体積9.8μL/m²)を軽く圧力

ヒドロキシプロビルメチルセルロース

4.0g

(メトキシ基28~30%、ヒドロキシプロビル基7~12%含有)

430mg

2%水溶液での20℃での溶液粘度が50cps)

オクチルフェノキシポリエトキシエタノール

8.7g

(平均10オキシエチレン単位含有)

水

27g

【0107】1-2: 血球分離要素の作製

50デニール相当のPET紡績糸を36ゲージ編みしたトリ

ポリエチレングリコール(平均分子量5万)

964.3g

コット編物布地(厚さ約250μm)に、下記組成の水溶液を含浸し、乾燥させた。

2.0g

素が設置され試薬の点着が行なわれる。インキュベータ部でインキュベーションが行なわれた分析要素はテーブルをさらに1/4回転させ次の待機部に移り、次いで1/4回転させて測光ステーションで4つの区画の発色が同時に測光され、測光の終了した分析要素はテーブルから排出される。

【0104】測定は各区画ごとに逐次行なってもよいが、複数の、好ましくは全ての区画に同時に測定試薬を点着し、インキュベートし、次いでそれぞれの測定項目に対応した波長で同時に測光できるようにしておくことができる。

【0105】本願発明の分析方法は、既述の分類1~分類3に対応するいずれの分野においても有効に利用することができる。検体として血液を用いる場合には、分析要素はごく微量の血液しか必要としないので、毛細管ピペット等の適当な器具を用いて採血することができ、分析要素は全血に対応していて、そのまま測定用液体試料とすることができる。更に、必要に応じて乾燥後の分析要素を、郵便、宅配便等で移送することが可能であり、在宅ケアの臨床医学検査においても有効である。

【0106】

【実施例】

実施例1

1. 多層分析スライドの作製

1-1: 血漿受容要素の作製

ゼラチン下塗りされている厚さ180μmのポリエチレンテレフタレート(PET)無色透明平滑シートの上に下記の成分から成る吸水層を乾燥後の厚さが15μmになるように塗布し、乾燥した。

四硼酸ナトリウム

水

2.0g

96g

次に上記含浸済みトリコット編物布地を80℃に加熱し、その表面に130℃に加熱し溶融したホットメルト型接着剤（新田ゼラチン製、H950）を、グラビア印刷法によりグラビアローラーからの転写によりドット状に付着させた。グラビアローラーのドットパターンは、ドット直径0.3mmの円、ドットの中心間距離0.6mm、ドット面積率約20%である。付着した接着剤の量は約2g/m²であった。次いで、接着剤が転写された直後の高温の布地の表面に、有効孔径3.0μm、厚さ140μm、空隙率約80%のセルロースアセテートメンブランフィルターの非光沢面向かい合わせてラミネートローラーの間を通して、両者をラミネートして接着一体化（部分接着）し血球分離要素を作成した。

【0108】1-3：多層分析要素の作製

この血球分離要素を1-2の工程と同様のグラビア印刷法による部分接着法により1-1の工程で作成した分析要素の下地に接着し、一体化させた。即ち、1-2の工程と同様にして、血球分離要素のメンブランフィルターの表面に加熱し溶融したホットメルト型接着剤（新田ゼラチン製、H950）をグラビア印刷法によりドット状に付着させた後、直ちに1-1の工程で作成した血漿受容要素の下地のプロード織物布地面側と向かい合わせ、両者をラミネートローラーの間を通して、ラミネートして接着一体化した。

【0109】1-4：多層分析スライドの完成

完成した多層分析要素を一辺15mmの正方形チップに裁断し、特開昭57-63452に記載の有機ポリマー製スライド枠に収めて、富士ドライケム5500アナライザー（富士写真フィルム（株）製）で測定可能な形状の多層分析スライドを完成した。

【0110】2. 測定

2-1：検体の調整

① G L U 用測定試薬

| | |
|--|--------|
| 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸 | 213mg |
| p-ノニルフェノキシポリグリシドール (平均10グリシドール単位含有) | 800mg |
| ジヒドロキシナフタレン | 110mg |
| 4-アミノアンチビリン | 140mg |
| グルコースオキシダーゼ | 1300U |
| ペルオキシダーゼ | 5000U |
| 蒸留水 | 10.0ml |

【0115】

② B U N 用測定試薬

| | |
|------------------------------|-------|
| Triton-X 100 (ローム アンド ハース社製) | 2g |
| o-フタルアルデヒド | 2g |
| N-1-ナフチル-N'-ジエチルエチレンジアミン碁酸 | 820mg |
| 蒸留水 | 10ml |

【0116】

ヘパリン入り健常者全血20mlを採取し、その一部を取って遠心分離し血球成分と血漿成分に分離した。血漿成分の一部を成分濃度既知のコントロール血清（富士ドライケムコントロールSH）と置換して成分濃度を調整した。血球成分とコントロール血清で置換した血漿とを再び混合することにより成分濃度の調整された全血を再構成した。

【0111】2-2：検体の点着

上記の多層分析スライドの上に採血したままの全血を、また他の上記スライドの上に検量線作製用に2-1で調製した全血をそれぞれ30μlづつ点着し、室温で30秒放置後ピンセットにて血球分離要素を血漿受容要素から剥離除去した。

【0112】2-3：脱水乾燥

2-2で得た分析スライドを、ポリエステル不織布で作られた透湿性の袋に入れた、粒径約1mmの顆粒状ゼオライト（新越化成工業（株））2gと共に5cm×7cmの防湿性アルミニウム箔をラミネートしたポリエチレンの小袋に入れ、密封して室温にて3時間保存した。

【0113】2-4：加熱刃による溶断

黄銅製のブロックを加工し先端に縦15mm、横15mmの十字型で、厚さ1mmの刃を有する熱溶断ヘッドを作成し、半田ごとの先端に取り付けた。スライダックにより電源電圧を制御することで熱溶断ヘッドの加熱温度を調節できるようにした。2-3で作成した乾燥後のスライドに溶断ヘッドを当て、260℃で2秒加熱することにより、展開層及び吸水層の全部とP E T支持体の一部を溶断して、4つの区画（No. 1～4）に分けた。

【0114】2-5：測定試薬溶液の調整

下記处方からなるグルコース（G L U）、尿素窒素（B U N）、コレステロール（T C H O）及び尿酸（U A）の各測定試薬溶液を調整した。

③ T C H O 用測定試薬

| | |
|--|--------|
| コレステロールエステラーゼ | 987 U |
| コレステロールオキシダーゼ | 600 U |
| ペルオキシダーゼ | 6614 U |
| Triton X-100 (ローム アンド ハース社製) | 0.5 g |
| 2-(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-5-フェネチルイミダゾール | 30mg |
| 下記処方のバッファー液 | 10ml |
| 磷酸・2カリウム870.9mgを蒸留水100mlに溶解した液50mlに、磷酸・1カ リウム・2水素680.5mgを蒸留水100mlに溶解した液を加えてpH7.5に調 整した液。 | |

【0117】

④ U A 用測定試薬

| | |
|---|--------|
| ウリカーゼ | 145 U |
| ペルオキシダーゼ | 6794 U |
| Triton X-100 (ローム アンド ハース社製) | 0.5 g |
| 2-(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-5-フェネチルイミダゾール | 30mg |
| 硼酸 0.15M | 10ml |

【0118】2-6：測定試薬の点着と測定

2-4で作製した4分画スライドの区画No. 1, 2, 3, 4に、それぞれ2-5で調整したG L U, B U N, T C H O 及びU A の測定試薬溶液の5μlを点着した。この際、スライドの展開層を構成する糸の断面は完全に溶着しており、試薬溶液が滲み出すことは無かった。また、吸水層からの液の滲み出しも無かった。発色反応を起こしたスライドを37°Cで6分間インキュベートし、測光ビームヘッドを調整してピーム径を4mmに絞った富士ドライケム5500アナライザーを用いて、それぞれの発色に相当する波長で反射光学濃度を測定した。各成分濃度と反射光学濃度との関係を検量線としてそれぞれの成分濃度を算出したところ、G L U=103mg/dL, B U N=21mg/dL, T C H O=157mg/dL, U A=4.6mg/dLであった。同じ無処理全血の1部を遠心分離して、日立7150を用いて各成分濃度を測定したところ、結果は、G L U=101mg/dL, B U N=20mg/dL, T C H O=154mg/dL, U A=4.3mg/dLであり、本発明の方法によって得られた値が実用に供しえる正確度を有していることが確認された。

| | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| ポリビニルアルコール P V A K L 506 (株) クラレ製) | 23.8 g/m ² |
| エボキシ系架橋剤 アラルダイト D Y 022 (チバガイギー社製) | 0.8 g/m ² |
| 界面活性剤 サーファクタント 10G (オーリン社製) | 2.0 g/m ² |

次に、2%の界面活性剤(オーリン社製 サーファクタント 10G)を20ml/m²の塗布量になるように均一に塗布し、吸水層を膨潤させた状態で、表面を親水化処理した厚さ150μmのポリエステル製平織物((株)クラレ製)を均一にラミネート接着し、乾燥した。更に、

【0119】2-7：繰り返し再現性

上記と同様の操作を10回繰り返して、繰り返し再現性を調べた。変動係数C V (%)はそれぞれ、G L U=4.2, B U N=5.1, T C H O=3.7, U A=2.8であり、十分精密度の高い測定法であることが判った。

【0120】実施例2

以下の、超音波を用いた方法でスライドを溶断した以外は、実施例1と同様の方法を繰り返したところ、同様の良好な結果を得た。

| | |
|-----------------|---------------------------|
| 溶断刃 | 実施例1と同じ形状のアルミ製ヘッド |
| 超音波発振装置装置 | B R A N S O N 超音波発振装置8700 |
| W E L D T I M E | 0.125秒にセット |
| H O L D T I M E | 0.2秒にセット |

【0121】実施例3

1. 多層分析スライドの作成

1-1: 多層フィルムの作製

実施例1と同様の支持体の上に下記処方の吸水層を設けた。(乾燥重量)

24gのヒドロキシプロビルセルローズ(信越化学製)と4gのノニオン界面活性剤(日本油脂(株)製H S 240)を含む水溶液1600gを調製し、250g/m²の塗布量で平織物の上に均一に塗布・乾燥し、多層フィルムを完成した。

【0122】1-2：多層分析スライドの作成
実施例1の1-4と同様にして、1-1で作製した多層フィルムをプラスチック枠に組み込んで、分析スライドを完成了。

【0123】2. 測定

2-1：検体の調整

実施例1の2-1と同様にして、血漿成分、及び成分濃度を調整した血漿成分を得た。

【0124】2-2：検体の点着

1-2に記載した多層分析スライドの上に、遠心分離して得た血漿成分を、また他の上記スライドの上に2-1

①TP

| | |
|-------------------|-------|
| 硫酸銅・5水和物 | 3.5g |
| 酒石酸 | 2.3g |
| 水酸化リチウム | 3.8g |
| セチルメチルアンモニウムプロマイド | 100mg |
| 水 | 10ml |

【0128】

②A1b

| | |
|------------------------------|-------|
| プロモクレゾールグリーン | 85mg |
| Triton-X 100 (ローム アンド ハース社製) | 100mg |
| クエン酸0.2M水溶液 (pH 3.5) | 10ml |

【0129】

③GGT

| | |
|-----------------------------|--------|
| L-α-グルタミル-3-カルボキシ-パラニトロアニリン | 58.5mg |
| グリシルグリシン | 156mg |
| 2Nトリス塩酸バッファー (pH 8.1) | 10ml |

【0130】

④GOT

| | |
|---|-------|
| トリスヒドロキシエチルアミノメタン | 84mg |
| 磷酸・1カリウム・2水素 | 104mg |
| L-アスパラギン酸 | 431mg |
| α-ケトグルタル酸 | 93mg |
| 20% MgCl ₂ | 273μl |
| POD | 343IU |
| TPP (コカルボキシラーゼ) | 21mg |
| FAD (フラビンアデニジヌクレオチド) | 5mg |
| オキザロ酢酸デハイドラーーゼ | 24U |
| POP G (ビルビン酸オキシダーゼ) | 3088U |
| 2-(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-5-フェネチルイミダゾール | 54mg |
| 1N NaOH | 3.4ml |
| 蒸留水 | 6.6ml |

【0131】2-6：測定試薬の点着と測定

2-4で得た、4分画された分析要素のNo.1～No.4に、TP、A1b、GOT、GGT用測定試薬溶液をそれぞれ5μlづつ点着した後、実施例1の2-5に記載した方法と同様にして、インキュベートし、測光した。採

で調製した血漿成分を、それぞれ20μlづつ点着した。

【0125】2-3：脱水乾燥

2-2で得た分析スライドを、実開平3-126499号公報に記載の定温乾燥器を用い、同公報に記載の条件で脱水乾燥した。

【0126】2-4：加熱刃による溶断

実施例1の2-4と同様にして、4つの区画 (No. 1～4) に分けた。

【0127】2-5：測定試薬溶液の調整

下記処方の測定試薬溶液を調製した。

血した全血から分離して得た血漿についての本発明の方
法による測定値、及び同じ血漿検体を日立7150アナライ
ザーで測定して得た値を表1に示す。

【0132】

【表1】

| 測定項目 | 本発明方法 | 日立7150 |
|--------------|-------|--------|
| T P (g/dL) | 6.8 | 6.9 |
| A l b (g/dL) | 3.7 | 4.0 |
| G O T (u/L) | 18 | 20 |
| G G T (u/L) | 24 | 27 |

【0133】この結果から、本発明の方法によって得られた値が実用に供しえる正確度を有していることが判った。

【0134】2-7：繰り返し再現性

上記と同様の操作を10回繰り返して、繰り返し再現性を

| 測定項目 | 平均値 | C V (%) |
|--------------|-----|---------|
| T P (g/dL) | 6.8 | 1.7 |
| A l b (g/dL) | 3.7 | 2.8 |
| G O T (u/L) | 18 | 3.5 |
| G G T (u/L) | 24 | 3.2 |

【0136】実施例4

実施例3で作製したのと同様の分析スライドを用いて、以下の実験及び評価を行った。血漿受容要素に10μlの血漿を点着し、直ちに乾燥剤（2gのゼオライト）と共に実施例1と同様にして密封し、室温（約20℃）に放置した。一定時間放置した後、血漿受容要素中の水分量を

| 放置時間 | 測定値 | | 含水量 (μg/受容要素) |
|------|------------------|----------------|------------------|
| | G l u (mg/dl) | G O T (u/L) | |
| 30分 | 240 | 328 | 1825(18%) |
| 1時間 | 266 | 359 | 754(7.5%) |
| 3時間 | 267 | 357 | 213(2.1%) |
| 6時間 | 273 | 358 | 196(2.0%) |
| 1日 | 264 | 348 | 165(1.7%) |
| 3日 | 267 | 353 | 158(1.6%) |
| 7日 | 258 | 355 | 162(1.6%) |

【0138】いずれの場合にも、放置1時間以降、7日間にわたって、安定性の優れた分析結果が得られることが判った。

【0139】

【発明の効果】本発明の分析方法によれば、微量の液体試料、特に体液試料を用いて容易に多項目の測定ができ

調べた。結果は表2の通りであり、十分精密度の高い測定法であることが判った。

【0135】

【表2】

ガスクロマトグラフィーを用いて測定し、同時に、実施例1及び3と同様にして、G l u濃度及びG O T活性を測定した。結果を表3に示す。

【0137】

【表3】

る。また、これら検体を点着した分析要素を確実に保存・移送でき、十分な分析精度で多項目を測定することができる。

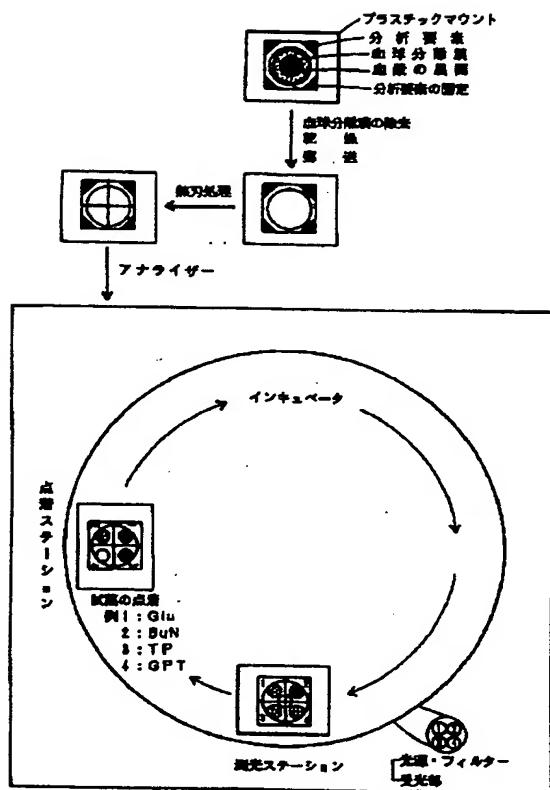
【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一実施態様を説明する図である。

(16)

特開平6-213886

【図1】



フロントページの続き

(72) 発明者 小川 雅司

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内